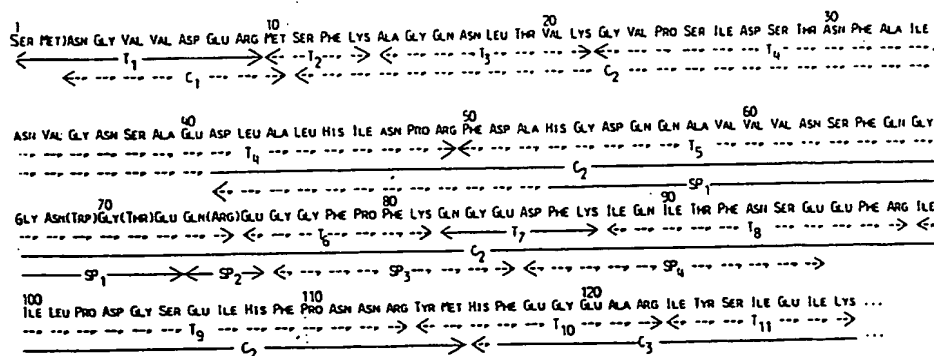




DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets⁴ : C07K 13/00, 7/06, 7/08 C07K 7/10, 3/20, A61K 39/395 G01N 33/577 // C07K 15/06 C07K 15/08	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 89/ 00581 (43) Date de publication internationale: 26 janvier 1989 (26.01.89)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR88/00370 (22) Date de dépôt international: 18 juillet 1988 (18.07.88) (31) Numéro de la demande prioritaire: 87/10288 (32) Date de priorité: 21 juillet 1987 (21.07.87) (33) Pays de priorité: FR (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): IDEON CORPORATION [US/US]; 301 Penobscott Drive, Redwood City, CA 94063 (US). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement) : STROSBERG, Arthur, Donny [BE/FR]; 66, rue de Javel, F-75015 Paris (FR); TEICHBERG, Vivian [IL/IL]; Institut Weizmann, 76 100 Rehovot (IL).		(74) Mandataires: ORES, Irène etc.; Cabinet Orès, 6, avenue de Messine, F-75008 Paris (FR). (81) Etats désignés: AT (brevet européen), AU, BE (brevet européen), CH (brevet européen), DE (brevet européen), DK, FI, FR (brevet européen), GB (brevet européen), IT (brevet européen), JP, KR, LU (brevet européen), NL (brevet européen), NO, SE (brevet européen), US. Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale.</i>

(54) Title: LECTINES FIXING BETA-D-GALACTOSIDE**(54) Titre:** LECTINES FIXANT LE BETA-D-GALACTOSIDE**(57) Abstract**

The present invention relates to amino acid sequences reproducing at least in part the sequence of animal and human lectines. The sequence of amino acids comprises a skeleton which is comprised of at least the following amino acids and in the following positions:

2	14	16	19	23	32
sérine	lysine	glycine	leucine	glycine	phénylalanine
35	37	41	45	46	
asparagine	glycine	leucine	leucine	histidine	
48	49	50	51		
asparagine	proline	arginine	phénylalanine	acide	
56	61	63	64	70	
aspartique	valine	asparagine	sérine	tryptophane	
71	73	75	76	81	
glycine	glutamine	arginine	glutamine	phénylalanine	
84	92	93	104	105	
glycine	thréonine	phénylalanine	leucine	proline	
106	107	112	113		
acide aspartique	glycine	phénylalanine	proline		
114					
asparagine.					

. Application particularly to the diagnostic of tumoral affections.

(57) Abrégé La présente invention est relative à des séquences d'acides-amino reproduisant au moins en partie la séquence des lectines animales et humaines. La séquence d'acides-amino comprend un squelette qui est composé d'au moins les acides-amino suivants et dans les positions suivantes:

2	14	16	19	23	32
sérine	lysine	glycine	leucine	glycine	phénylalanine
35	37	43	45	46	
asparagine	glycine	leucine	leucine	histidine	
48	49	50	51		
asparagine	proline	arginine	phénylalanine	acide	
56	61	63	64	70	
aspartique	valine	asparagine	sérine	tryptophane	
71	73	75	76	81	
glycine	glutamine	arginine	glutamine	phénylalanine	
84	92	93	104	105	
glycine	thréonine	phénylalanine	leucine	proline	
106	107	112	113		
acide aspartique	glycine	phénylalanine	proline		
114					
asparagine.					

. Application au diagnostic d'affections tumorales, notamment.

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT Autriche	FR France	ML Mali
AU Australie	GA Gabon	MR Mauritanie
BB Barbade	GB Royaume-Uni	MW Malawi
BE Belgique	HU Hongrie	NL Pays-Bas
BG Bulgarie	IT Italie	NO Norvège
BJ Bénin	JP Japon	RO Roumanie
BR Brésil	KP République populaire démocratique de Corée	SD Soudan
CF République Centrafricaine	KR République de Corée	SE Suède
CG Congo	LI Liechtenstein	SN Sénégal
CH Suisse	LK Sri Lanka	SU Union soviétique
CM Cameroun	LU Luxembourg	TD Tchad
DE Allemagne, République fédérale d'	MC Monaco	TG Togo
DK Danemark	MG Madagascar	US Etats-Unis d'Amérique
FI Finlande		

Lectines fixant le beta-D-galactoside

La présente invention est relative à l'isolement d'une lectine d'origine humaine, à la détermination de la séquence en amino-acides de lectines de provenances diverses, y compris des lectines d'origine humaine, et à leur synthèse, à l'application desdites séquences en thérapeutique en tant qu'immunostimulant et immunosuppresseur et en tant qu'agent interféron-like, pour le traitement de certaines viroses et certaines formes de cancer, à la production d'anticorps polyclonaux et monoclonaux anti-lectines et à leur application à l'immuno-diagnostic, à l'identification et l'isolement des gènes des lectines qui reconnaissent les séquences en amino-acides susdites, à l'utilisation de l'expression de ces gènes pour la production de lectines, de séquences en amino-acides et d'oligonucléotides propres à celles-ci.

Les lectines sont des protéines qui ont été trouvées dans une grande variété de vertébrés allant de l'anguille électrique (d'où leur nom) aux oiseaux et aux mammifères.

Les lectines sont des protéines qui fixent les sucres et se combinent avec des mono- et avec des oligosaccharides par des liaisons autres que co-valentes. Toutes les lectines sont des protéines oligomères comportant plusieurs sites de liaison de saccharides par molécule, c'est-à-dire qu'elles sont multivalentes. Cette structure polyvalente confère aux lectines l'aptitude d'agglutiner des cellules portant sur leur membrane externe les fractions saccharidiques appropriées.

Au cours des vingt dernières années, plusieurs centaines de lectines principalement extraites de plantes, ont été purifiées et caractérisées. Les lectines sont utilisées en tant que réactifs pour la purification et la caractérisation de glycoconjugués ou en tant que mitogènes de classes spécifiques de lymphocytes.

Actuellement, certaines lectines sont utilisées dans des banques de sang pour le typage du sang, principalement en raison de l'indisponibilité d'anticorps anti-O(H) naturels et

- 2 -

en raison du fait que certaines d'entre elles distinguent les sous-groupes sanguins A₁ et A₂. Occasionnellement, les lectines sont utilisées pour la séparation de populations d'érythrocytes mixtes, par exemple dans les rares cas de mosaïques de groupes sanguins résultant de la formation de chimères, de mutations somatiques ou de transplantations de moëlle osseuse. D'autre part, comme certaines lectines [par exemple la phytohemagglutinine (PHA) et la concanavaline A] stimulent les lymphocytes B (par exemple le mitogène de phytolaque), les lectines sont également utilisées pour identifier les principales sous-populations de lymphocytes. Contrairement aux antigènes qui ne stimulent qu'une faible proportion des lymphocytes (habituellement de 0,02 à 0,2 %), les lectines stimulent une proportion élevée (jusqu'à 70-80 %) de cellules B, quelle que soit la spécificité antigénique des lymphocytes récepteurs. Les lectines sont donc des activateurs polyclonaux ou des ligands polyclonaux. Elles sont utilisées dans l'étude du mécanisme par lequel un antigène agissant à la surface de la cellule lymphoïde favorise spécifiquement ou inhibe spécifiquement l'expansion clonale et la synthèse des immunoglobulines. Comme autres produits synthétisés par des lymphocytes stimulés par des lectines, il faut citer diverses lymphokines, telles que l'interleukine 2 (Il-2) et l'interféron. La stimulation mitogénique, en particulier par la PHA, est également utilisée en tant qu'outil de diagnostic pour la détection de déficiences immunologiques congénitales et acquises, pour la détection de sensibilisations dues à des agents infectieux ou liées à certaines maladies auto-immunes, et pour le contrôle des effets de divers traitements immunosuppresseurs et immunothérapeutiques. Une autre application particulièrement utile de la stimulation des lymphocytes par ces lectines est représentée par les études cytogénétiques des chromosomes humains et animaux.

Les lectines sont également largement utilisées par les immunologistes pour étudier les propriétés et la consti-

- 3 -

tution des membranes de lymphocytes. En utilisant des dérivés appropriés de lectines, il est possible d'examiner non seulement la répartition des récepteurs de lectines sur la surface des lymphocytes, mais également la mobilité des récepteurs dans la membrane, et de démontrer, par exemple, que la redistribution et le capping des récepteurs sur les surfaces des lymphocytes résultent de la fixation des lectines.

Les récepteurs de lectines, c'est-à-dire les constituants membranaires qui réagissent avec les lectines, peuvent être détectés sur des électrophorétogrammes ou être isolés sous une forme purifiée par les mêmes méthodes que celles qu'on utilise pour isoler des antigènes de surface à l'aide des anticorps correspondants. La détection est réalisée de préférence par coloration de la lectine dans les électrophorétogrammes de préparations de membranes. Les récepteurs peuvent être isolés à partir de membranes solubilisées, par précipitation soit par la lectine seule, soit en utilisant cette dernière associée à un anticorps antilectine ; les meilleurs résultats sont obtenus par isolement desdits récepteurs par chromatographie d'affinité sur des lectines immobilisées.

L'existence dans de nombreux tissus de vertébrés d'une activité lectine endogène fixant de façon spécifique le β -D-galactoside, a été démontrée en 1974 et attribuée à la famille de protéines dénommée "électrolectines" (en raison du fait que la première lectine animale décrite avait été isolée de l'organe électrique de l'anguille électrique - *electrophorus electricus*). Des lectines ont été isolées, depuis, de muscle, de rein, de coeur et d'intestin d'embryon de poulet, de coeur, de poumon et de rate de veau, de poumon de rat, de muscle de singe, de poumon et de muscle humain. De façon remarquable, les différentes lectines identifiées à ce jour présentent des propriétés très similaires à celles décrites pour l'électrolectine de l'anguille électrique. Toutes agglutinent les érythrocytes de lapin traités par la trypsine, toutes sont indiquées comme ayant principalement une locali-

- 4 -

sation cytoplasmique intercellulaire, toutes ont un poids moléculaire compris entre 15 000 et 30 000 daltons et se composent de deux à quatre sous-unités, toutes possèdent la même affinité pour les saccharides suivants, dans un ordre décroissant :

5 β -D-galactosyl-thiogalactopyranoside (TDG) > lactose > D-galactose.

Toutes les lectines identifiées à ce jour ont été indiquées comme requérant la présence d'agents réducteurs pour le maintien de leur activité d'agglutination.

De plus, il a été montré que les lectines de divers tissus du même animal et que les lectines de tissus homologues de mammifères différents, présentent une réactivité antigénique croisée.

15 Les fonctions biologiques des lectines de vertébrés ne sont pas encore établies avec certitude. Il est cependant remarquable que leur concentration dans les tissus est régulée en fonction du développement et qu'elles sont associées à des processus néoplastiques. Chez l'animal adulte, les lecti-
20 nes de vertébrés sont principalement présentes dans des organes impliqués dans les défenses immunitaires (c'est-à-dire le thymus, le placenta, la peau). Les lectines présentant une spécificité vis-à-vis du lactose présentent des propriétés immunomodulatrices dans des maladies auto-immunes provoquées
25 expérimentalement (telles que myasthenia gravis et diabète type I).

Les données actuellement disponibles indiquent que les lectines présentent une ressemblance structurale avec les interférons, qui sont des lymphokines déjà expérimentées en
30 thérapie humaine pour certaines viroses et certaines formes de cancer. De plus, comme indiqué plus haut, l'étude fonctionnelle de l'électrolectine d'anguille a montré des propriétés immunosuppressives dans une forme expérimentale de myasthénie grave provoquée par l'injection de récepteur
35 d'acétylcholine. Ces deux types d'observations suggèrent que

- 5 -

les lectines pourraient être utilisées en clinique soit en tant que lymphokines, soit/et en tant que protéines immuno-suppressives et en immunodiagnostic en utilisant la réaction de protéines antigéniques tumorales avec des anticorps anti-
5 lectines.

Dans le but d'étudier la régulation de l'expression et les fonctions biologiques des lectines de vertébrés, GITT et BARONDES (PROC.NATL.ACAD.SCI.USA, Vol. 83, p. 7603-7607, Octobre 1986) ont visé à déterminer les séquences des lec-
10 tines et plus particulièrement celle d'une lectine dimère humaine fixant le β -D-galactoside, dont la sous-unité présente un poids moléculaire de 14 000 daltons, cette lectine provenant de poumon humain. Ces Auteurs ont isolé deux clones de cDNA par immunocriblage d'une banque de cDNA d'hépatome
15 humain, à l'aide d'un antisérum qui se lie spécifiquement à une lectine fixant le β -D-galactoside, de P.M. = 14 000 daltons. Ils ont trouvé que les séquences d'acides aminés des inserts de ces deux clones qu'ils ont ainsi déduites, présentent une homologie importante entre elles, avec la séquence
20 de la lectine de peau de poulet, qui fixe le β -D-galactoside, et avec 8 peptides dérivés de lectine de poumon humain purifiée, de P.M. = 14 000 daltons. Cependant, des différences entre les séquences des deux clones d'hépatome et entre chacun de ces clones et les peptides de poumon humain, leur ont
25 suggéré qu'il existerait au moins trois variantes du gène qui code pour cette lectine, qui seraient exprimées dans le tissu humain, étant cependant noté qu'ils n'ont pas établi la nature des protéines codées par les clones 1 et 2 d'hépatome humain.

30 Etant donné l'importance du rôle physiologique des lectines dans les événements ontogéniques et les étapes de différenciation, il est apparu nécessaire d'établir l'homologie entre les diverses lectines de vertébrés en déterminant dans toute la mesure du possible leurs séquences, et d'élargir les sources disponibles de lectines homologues, notamment
35

- 6 -

en vue de leur utilisation thérapeutique et pour le diagnostic.

C'est dans ces conditions que les Inventeurs ont déterminé l'homologie structurale de différentes lectines qui
 5 lient le β -D-galactoside, en établissant les séquences en amino-acides de ces lectines, isolées de l'anguille électrique et de placenta humain ; ils ont comparé les séquences qu'ils ont établies, avec des séquences publiées précédemment, déduites des cADN codant pour les lectines fixant le
 10 β -D-galactoside, isolées de peau d'embryon de poulet et d'hépatome humain, respectivement, et avec la séquence partielle en aminoacides de la lectine de poumon humain ; ils ont ainsi mis en lumière les homologies importantes entre ces lectines d'origines diverses.

15 La présente invention a pour objet une séquence d'amino-acides correspondant à au moins une partie de la séquence des lectines fixant le β -D-galactoside, qui est caractérisée en ce qu'elle comprend un squelette d'amino-acides qui est composé d'au moins les amino-acides suivants, dans
 20 les positions suivantes :

	2	14	16	19	23	32
	sérine	lysine	glycine	leucine	glycine	phenylalanine
	35	37	43	45	46	
	asparagine	glycine	leucine	leucine	histidine	
25	48	49	50	51		
	asparagine	proline	arginine	phenylalanine	acide	
	56	61	63	64	70	
	aspartique	valine	asparagine	serine	tryptophane	
	71	73	75	76	81	
	glycine	glutamine	arginine	glutamine	phenylalanine	
	84	92	93	104	105	
30	glycine	thréonine	phenylalanine	leucine	proline	
	106	107	112	113		
	acide aspartique	glycine	phénylalanine	proline		
	114					
	asparagine.					

- 7 -

Conformément à la présente invention, le squelette d'acides-amino correspondant à au moins une partie de la séquence desdites lectines, comprend en outre les acides-amino suivants, dans les positions suivantes :

5	3	5	28	53	54
	asparagine	valine	acide aspartique	alanine	histidine
	55	67	68	72	74
	glycine	glycine	glycine	thréonine	glutamine
	91	102	103	109	proline
	isoleucine	isoleucine	isoleucine	acide glutamique	
	132	133			
10	isoleucine	lysine			

Egalement conformément à l'invention, le squelette d'acides-amino correspondant à au moins une partie de la séquence desdites lectines, comprend en outre les acides-amino suivants, dans les positions suivantes :

	8	10	26	27	29	30
15	thréonine	asparagine	alanine	proline	alanine	lysine
	31	32	36	38	39	40
	sérine	valine	leucine	lysine	acide aspartique	sérine
	47	53	54	55	58	
	phénylalanine	alanine	histidine	glycine	asparagine	
	60	62	72	74	78	80
	isoleucine	cystéine	thréonine	glutamine	valine	proline
20	82	91	110	115	116	
	glutamine	isoleucine	phénylalanine	arginine	leucine	
	118	128	129			
	leucine	glycine	acide aspartique			

Selon une autre disposition de l'invention, le squelette d'acides-amino correspondant à au moins une partie de la séquence desdites lectines, comprend en outre les acides-amino suivants, dans les positions suivantes :

	4	6	18	20	21	22
	glycine	valine	glutamine	thréonine	valine	lysine
	52	53	54	55	72	74
	aspartique	alanine	histidine	glycine	thréonine	glutamine
	80	91	96			
30	proline	isoleucine	asparagine			

Selon encore une autre disposition de l'invention, le squelette d'acides-amino correspondant à au moins une partie de la séquence desdites lectines, comprend en outre les acides-amino suivants, dans les positions suivantes :

- 8 -

28 67 68 74 79
acide aspartique glycine glycine glutamine phénylalanine

Selon une autre disposition de l'invention, le squelette d'acides-amino correspondant à au moins une partie de la séquence desdites lectines, comprend en outre les acides-amino suivants dans les positions suivantes :

26 27 29 30 31 33 36
alanine proline alanine lysine sérine valine leucine
38 39 40 74 78
lysine acide aspartique sérine glutamine valine
79 109 110 115 116
phénylalanine glutamine phénylalanine arginine leucine
10 118 123
leucine tyrosine

Selon encore une autre disposition de l'invention, la séquence d'acides-amino comprend au moins les 129 acides-amino suivants, qui sont présents selon la même séquence dans la lectine de l'anguille électrique :

15 1 10
(SER MET) ASN GLY VAL VAL ASP GLU ARG MET SER PHE LYS ALA
20
GLY GLN ASN LEU THR VAL LYS GLY VAL PRO SER ILE ASP SER THR
30 40
ASN PHE ALA ILE ASN VAL GLY ASN SER ALA GLU ASP LEU ALA LEU
50
20 HIS ILE ASN PRO ARG PHE ASP ALA HIS GLY ASP GLN GLN ALA VAL
60 70
VAL VAL ASN SER PHE GLN GLY GLY ASN (TRP)GLY(THR) GLU GLN(ARG)
80
GLU GLY GLY PHE PRO PHE LYS GLN GLY GLU ASP PHE LYS ILE GLN
90 100
ILE THR PHE ASN SER GLU GLU PHE ARG ILE ILE LEU PRO ASP GLY
25 110
SER GLU ILE HIS PHE PRO ASN ASN ARG TYR MET HIS PHE GLU GLY
120
GLU ALA ARG ILE TYR SER ILE GLU ILE LYS...

Selon une autre disposition avantageuse de l'invention, la séquence d'acides-amino comprend au moins les acides-amino suivants, qui sont présents selon la même séquence dans la lectine du placenta humain :

- 9 -

1	4	6	8	10	11									
SER()	ASN	TYR	VAL	SER()	THR()	ASN								
18	20	21	23	26	28									
30	31	34	35	36	40	41	42	43						
LYS	SER	PHE	VAL	LEU	ASN	LEU	GLY	LYS	ASP	SER	ASN	ASN	LEU	CYS
45	46	48	50	51	53	54	55	56						
LEU	HIS	PHE	ASN	PRO	ARG	PHE	ASN	ALA	HIS	GLY	ASP	ALA	ASN	THR
60	61	67	68	70	71	72	74							
ILE	VAL	CYS	ASN	SER()	ASP	GLY	GLY	ALA	TRP	GLY	THR	GLU	GLN	
78	80	81	82	83	84	85	86	87	88					
ARG	GLU	ALA	VAL	PHE	PRO	PHE	GLN	PRO	GLY	SER	VAL	ALA	GLU	
89	90	91	92	93	94	95	96	97	100	101	102	103		
10	VAL()	ILE	THR	PHE	ASP	GLN	ALA	ASN	LEU	LEU	VAL	ILE	ILE	
104	105	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	118		
LEU	PRO	ASP	GLY	LEU	GLU	PHE	LYS	PHE	PRO	ASN	ARG	LEU	ASN	LEU
119	120	121	123	125	128	130	131	132	133					
GLU	ALA	ILE	ASN	LEU	MET	ALA	ALA	ASP	GLY	ASP	PHE	LYS	ILE	LYS
134	135													

15 Les séquences d'acides-amino conformes à la présente invention correspondent à au moins une partie de la séquence de lectines qui fixent le β -D-galactoside, présentent une affinité plus grande pour le β -D-galactosyl-thiogalactopyranoside que pour le lactose et plus grande pour ce dernier que pour le galactose, et requièrent des agents réducteurs pour maintenir leur activité agglutinante ; ces séquences comprennent des déterminants essentiels desdites lectines et présentent une réactivité croisée à l'égard d'anticorps dirigés contre des lectines d'origines diverses, tant humaine qu'animales.

25 Conformément à la présente invention, les acides-amino de la séquence qui reproduit celle de la lectine de l'anguille électrique entrent dans la composition de plusieurs peptides qui ont été analysés par dégradation, dans un micro-séquenceur en phase gazeuse, et dont les acides-amino qui les composent ont été identifiés par chromatographie haute pression en phase liquide (HPLC), les peptides suivants ayant ainsi été identifiés :

- (1) Asn - Ser - Glu - Glu - Phe - Arg
- 35 (2) Ala - Gly - Gln - Asn - Leu - Thr - Val

- 10 -

- (3) Phe - Asn - Ser - Glu - Glu - Phe - Arg
 (4) Tyr - Met - His - Phe - Glu - Gly - Glu - Ala - Arg
 (5) Glu - Gly - Gly - Phe - Pro
 (6) Ile - Tyr - Ser - Ile - Glu - Ile
 5 (7) Ile - Tyr - Ser - Ile - Glu - Ile - Lys
 (8) Phe - Asp - Ala - His - Gly - Asp - Gln - Gln - Ala -
 Val - Val - Val - Asn - Ser - Phe - Gln - Gln - Asn
 (9) Ile - Gln - Ile - Thr - Phe - Asn - Ser - Glu - Glu -
 Phe - Arg
 10 (10) Ile - Ile - Leu - Pro - Asp - Gly - Ser - Glu - Ile -
 His - Phe - Pro - Asn - Asn - Arg
 (11) Gly - Val - Pro - Ser - Ile - Asp - Ser - Thr - Asn -
 Phe - Ala - Ile - Asn - Val - Gly - Asn - Ser - Ala -
 Glu - Asp - Leu - Ala - Leu - His - Ile - Asn - Pro -
 15 Arg
 (12) Gly(Thr) - Glu - Gln.

Conformément à l'invention, dans les séquences d'acides-amino conformes à la présente invention qui correspondent au moins à une partie de la séquence des lectines telles que définies plus haut, les acides-amino sont organisés en structures en feuillets plissés β et lesdites séquences comprennent au moins 10 feuillets plissés β dans des positions qui correspondent aux positions d'acides-amino communes aux lectines de diverses origines.

25 Les séquences d'acides-amino conformes à la présente invention se distinguent, en outre, par leur caractère hydrophobe, établi à l'aide de l'échelle d'hydropathie de KYTE ET DOOLITTLE.

30 Les séquences d'acides-amino conformes à la présente invention se distinguent également par le fait que le tryptophane qu'elles contiennent se trouve dans une position comprise entre la position 69 et la position 76 de la séquence, ainsi que deux résidus acide glutamique, et en ce que la région 69-76 forme au moins en partie le site de fixation du β -D-galactoside.

- 11 -

Lesdites séquences d'acides-amino se distinguent d'autre part par le fait qu'elles contiennent au moins deux résidus cystéine ou demi-cystine qui se trouvent en positions 44 et 62 et dont l'état chimique devrait jouer un rôle important dans l'intégrité fonctionnelle de la protéine.

Les séquences d'acides-amino conformes à la présente invention se distinguent en outre par le fait qu'elles comportent un peptide terminal bloqué sur l'azote, qui se compose d'une séquence Ser - Met N-acétylée.

La présente invention a également pour objet un procédé de purification de lectines fixant le β -D-galactoside, à partir de tissus d'animaux vertébrés et notamment de l'anguille électrique et de placentas humains, par homogénéisation et fractionnement des tissus animaux, puis isolement par chromatographie d'affinité à l'aide d'une matrice de lactosyl-Sépharose, lequel procédé est caractérisé en ce que le tampon d'élution utilisé pour isoler les lectines est constitué par une solution saline, pH 7,2, tamponnée par du phosphate, additionnée de lactose et de 2-mercaptoéthanol.

La présente invention a, de plus, pour objet un procédé de détermination des séquences - ou séquençage - d'acides-amino correspondant au moins à une partie de la séquence des lectines fixant le β -D-galactoside définies plus haut, qui est caractérisé en ce qu'il met en oeuvre une technique, connue en elle-même, de dégradation automatique, telle que notamment la technique mise au point par EDMAN, avec addition de polybrène.

La présente invention a également pour objet un procédé de synthèse de séquences d'acides-amino correspondant au moins à une partie de la séquence des lectines fixant le β -D-galactoside, définies plus haut, caractérisé en ce que ladite synthèse est réalisée en mettant en oeuvre une méthode dérivée de la méthode de BERGMAN et ZERVAS qui utilise des groupes protecteurs pour protéger les fonctions réactives des acides-amino à partir desquels sont formées lesdites séquen-

- 12 -

ces, et des méthodes de couplage appropriées pour coupler les amino-acides entre eux.

La présente invention a, en outre, pour objet des anticorps polyclonaux anti-lectine placentaire humaine, caractérisés en ce qu'ils sont essentiellement constitués par des sérums obtenus à partir de sang d'animaux immunisés par injection de lectine purifiée par chromatographie d'affinité.

La présente invention a également pour objet des anticorps monoclonaux anti-lectine placentaire humaine, caractérisés en ce qu'ils sont constitués par des clones isolés à partir d'hybridomes obtenus par fusion de cellules tumorales appropriées, SP-2-O ou NS-1 notamment, avec des splénocytes de souris immunisées contre la lectine de placenta humain convenablement purifiée.

La présente invention a également pour objet les applications de ces anticorps polyclonaux et monoclonaux en tant qu'agents de diagnostic et agents thérapeutiques pour la détection ou le traitement d'affections impliquant les défenses immunitaires.

Outre les dispositions qui précèdent, l'invention comprend encore d'autres dispositions qui ressortiront de la description qui va suivre, qui comprend des exemples d'obtention des séquences d'amino-acides définies dans ce qui précède et des méthodes de contrôle de l'activité de lectines fixant le β -D-galactoside, de ces séquences, en référence aux dessins annexés dans lesquels :

la Figure 1 représente la séquence en acides aminés de la lectine d'anguille électrique, faisant apparaître l'alignement des peptides et des fragments qui la composent ;

la Figure 2 représente un profil HPLC typique d'une digestion de l'électrolectine par la trypsine, dans lequel chacune des fractions obtenues par digestion a été analysée dans un séquenceur en phase gazeuse et dans lequel la séquence correspondante est indiquée au-dessus du pic ;

la Figure 3 représente une comparaison des séquences

- 13 -

obtenues respectivement pour les lectines fixant le β -D-galactoside, isolées d'anguille électrique, de placenta humain (Hum.p.), et de poumon humain (Hum. l.) avec celles obtenues à partir des cDNA de peau d'embryon de poulet et d'hépatome humain Li-7 ("Hum.hep.1", "Hum.hep.2") ;

la Figure 4 représente les structures en feuillets plissés β et les profils d'hydropathie des lectines fixant le β -D-galactoside isolées de poulet et d'anguille électrique. Les deux courbes du haut ont été calculées à l'aide de la méthode de CHOU & FASMAN [(BIOCHEMISTRY, 13, (1974), 211-222] ; les deux courbes du bas ont été calculées en utilisant l'échelle d'hydropathie de KYTE & DOOLITTLE [J. MOL. BIOL. 157 (1982) 105-132].

la figure 5 représente la migration de la lectine humaine en gel de polyacrylamide, obtenue par électrofocalisation ;

la figure 7 représente les espèces moléculaires identifiées par hybridation, par la méthode de SOUTHERN, et

la figure 8 représente un immunoblot de migration de lectine purifiée.

Il doit être bien entendu, toutefois, que ces exemples sont donnés uniquement à titre d'illustration de l'objet de l'invention, dont ils ne constituent en aucune manière une limitation.

EXEMPLE I - Purification de lectine fixant le β -D-galactoside, à partir d'anguille électrique

Des anguilles électriques, *Electrophorus electricus*, (obtenues vivantes du WORLDWIDE PARAMOUNT AQUARIUM/ARDSLEY, N.Y.) ont été décapitées et leur principal organe électrique a été découpé en petits cubes et congelé à -20°C .

L'homogénéisation des tissus et le fractionnement ont été réalisés comme décrit par LEVI & TEICHBERG, J. BIOL. CHEM., 256 (1981), 5735-5740. Les lectines ont été isolées par chromatographie d'affinité sur une matrice de lactosyl-Sepharose, comme décrit dans cette dernière Publication. Le

- 14 -

tampon d'élution était constitué par une solution saline, pH 7,2, tamponnée par 0,01 M de phosphate et additionnée de 100 mM de lactose et 14 mM de 2-mercapto-éthanol.

La pureté de la lectine éluée a été vérifiée par électrophorèse sur polyacrylamide-dodécylsulfate de sodium et son activité après dialyse contre une solution saline tamponnée au phosphate, a été contrôlée sur des érythrocytes de lapins trypsinisés dans un test quantitatif d'hémogglutination effectué sur des plaques de microtitration comme décrit également dans la Publication précitée.

EXEMPLE II - Purification de lectine fixant le B-D-galactoside à partir de placenta humain

Des placentas humains frais provenant d'accouchements nocturnes ont été maintenus sur de la glace jusqu'à leur collecte et leur traitement, dès le matin suivant.

La lectine a été récupérée en procédant comme décrit à l'Exemple I.

La pureté et l'homogénéité de la lectine placentaire humaine ont été vérifiées par électrophorèse en polyacrylamide en présence d'un gradient de pH (technique dite d'"isofocalisation") suivant la procédure suivante :

Le pHi de la lectine humaine (ELH) est déterminé par isoélectrofocalisation (IEF), en procédant comme suit :

Technique

25 Gel polyacrylamide solution stock

24,25 g acrylamide.

0,75 g bis acrylamide.

2,50 g amberlite MB-6 (Pharmacia).

250,00 ml eau distillée.

30 Préparation du gel (plaques 115 x 230 mm)

Filtrer 15 ml de la solution stock.

1,90 ml Pharmalyte (Gradient pH 3.10).

4,00 ml glycérol.

Ajuster à 30 ml avec H₂O.

35 Dégazer.

- 15 -

Ajouter 300 µl N,N,N',N'-tétraméthyl-éthylendiamin (TEMED).

Couler le gel.

Laisser polymériser une heure.

5 Migration :

Placer le gel sur le plateau réfrigérant de l'appareil.

Disposer les électrodes de chaque côté, bandelette de papier LKB imprégnée d'une solution H_3PO_4 , 1 M pour l'anode et NaOH 1 M pour la cathode.

Préfocalisation.

20 minutes à puissance constante 40 mW.

Dépôt des échantillons (à 1 cm de l'anode).

Sur papier LKB de 1 x 0,5 cm.

15 ELH : 20 µl déposé d'une solution à 600 µg/ml soit 12 µg.

Protéines témoin : 20 µl solution étalon Pharmacia.

Migration : 1h30, puissance 40 mW constante.

Révélation :

20 Fixation 45 minutes acide trichloracétique 10 % puis 30 minutes dans une solution 30 % éthanol 5 % acide acétique.

Coloration 1 heure au bleu de Coomassie.

Décoloration dans éthanol 40 % + 5 % acide acétique.

Séchage.

25 On trace alors la courbe $pH_i = f$ (distance de migration) (cm) pour les protéines étalon.

Le pH_i de la lectine humaine ainsi déterminé est de 5,25, comme le montre la figure 5 annexée.

EXEMPLE III - Séparation et purification des peptides

30 1. Digestions enzymatiques.

a) La digestion par la trypsine a été réalisée dans du NH_4HCO_3 1 % par addition de 10 µg de trypsine traitée par de la tosylphénylalanylchlorométhylcétone, dissoute dans 0,01 mM d'HCl, à 1 mg de lectine isolée d'anguille électrique ou de placenta humain, comme décrit aux Exemples I et II ci-

- 16 -

dessus. Au bout de 6 heures de digestion enzymatique à 37°C, 10 µg supplémentaires de trypsine ont été ajoutés et la digestion a été arrêtée 6 heures plus tard en abaissant le pH jusqu'à 4. Le produit de digestion a été séparé par HPLC sur
5 une colonne RP 300 en utilisant le gradient suivant :

solvant A : H₂O/0,1 % TFA

solvant B : CH₃CN 80 %/H₂O 20 %/0,1 % TFA

(TFA = Acide trifluoroacétique).

Les deux solvants ont été dégazés par passage d'un
10 courant d'hélium. La séparation a été menée à son terme en utilisant un gradient de 0 % de solvant B à 40 % de solvant B en l'espace de 8 heures, à un débit de 0,5 ml/minute. Le détecteur à longueur d'ondes variable a été réglé à 206 nm avec une sensibilité de 0,2 nm. La température de l'opération
15 était de 25°C.

b) La digestion par la protéase de *Staphylococcus aureus* (décrite dans HOUMARD & DRAPEAU, PROC. NATL. ACAD. SCI., 69, 3506-3509) a été réalisée dans des conditions propres à réaliser le clivage au niveau des liaisons peptidiques
20 Glu-X : 10 µg de l'enzyme (fournie par MILES LABORATORIES) ont été ajoutés à 1 mg de lectine dans 50 mM de NH₄HCO₃ à pH 7,8 et la digestion s'est poursuivie pendant 18 heures à 37°C. Les peptides résultants ont été séparés par HPLC comme décrit plus haut.

25 2. Clivage par le bromure de cyanogène.

Ce clivage a été réalisé dans de l'acide formique à 70 %, à 25°C pendant 24 heures à l'obscurité, en utilisant 10 mg de bromure de cyanogène pour 1 mg de lectine.

Les fragments résultants ont été séparés par gel-
30 filtration sur du Sephadex G-50 Superfine, en présence de chlorhydrate de guanidine 5M. Les fragments ont été relargués sur du Sephadex G-25 dans du NH₄HCO₃ à 1 % et lyophilisés.

Les peptides obtenus par digestion par la trypsine et par la protéase de *Staphylococcus aureus*, ont été séparés
35 par chromatographie en phase inverse sur un instrument de

- 17 -

WATERS, et contrôlés à 206 nm à l'aide d'un spectrophotomètre 440. La plupart des séparations ont été réalisées sur une colonne RP 300 (fournie par BROWNLEE) dans des tampons d'acide trifluoroacétique (TFA) à 1 %, en utilisant les gradients décrits plus haut.

EXEMPLE IV - Séquençage des amino-acides contenus dans les peptides de lectine.

1. Analyse de la séquence.

Les différents peptides ont été analysés par dégradation d'EDMAN automatisée, dans un microséquenceur en phase gazeuse (commercialisé par APPLIED BIOSYSTEMS). Du polybrène traité chimiquement (vendu sous la marque "CHEMUBRENE" par CHEMUNEX, PARIS) a été ajouté pour empêcher l'extraction des peptides et pour améliorer les rendements. Les amino-acides de la phénylthiohydantoïne ont été identifiés par HPLC sur un instrument de WATERS équipé d'une colonne RP 18 de 5µ de diamètre (fournie par BROWNLEE) en utilisant un gradient d'acétate de sodium/acétonitrile.

a) Analyse des fragments de lectines clivés par le bromure de cyanogène.

La composition en amino-acides de la lectine d'anguille indique la présence de trois résidus méthionine. Pour tirer avantage de la présence de ces résidus, la protéine a été hydrolysée en utilisant du bromure de cyanogène dans de l'acide formique à 70 %. On n'a isolé qu'un seul long fragment et un petit fragment, qui ont été purifiés et partiellement séquencés. Le troisième peptide à azote terminal (bloqué) n'a pas été récupéré.

Les résultats de ces clivages sont résumés dans la Figure 1 annexée qui représente l'alignement des peptides et des fragments de lectine isolée d'anguille électrique ; dans cette Figure, C₁, C₂ et C₃ désignent les fragments obtenus par clivage par le bromure de cyanogène. En remplaçant l'acide formique à 70 % par une solution 50:50 HFBA/acide formique (HFBA = acide heptafluorobutyrique), on a observé un clivage

- 18 -

en un site supplémentaire, qui correspond selon toute probabilité à une liaison peptidique tryptophane -X (X: acide non identifié). Ce nouveau peptide a été partiellement séquencé pour obtenir la séquence Gly-(Thr)-Glu-Gln.

5 b) Analyse des peptides résultant de la digestion par la trypsine.

La majeure partie de la séquence de la lectine d'anguille électrique et la totalité des résultats relatifs à la protéine humaine ont été obtenus par analyse des peptides obtenus par digestion par la trypsine, séparés sur une colonne RP 300 comme décrit au paragraphe 1.a) du présent Exemple.

La Figure 2 annexée représente une séparation typique obtenue sur colonne RP 300 ; les séquences des peptides correspondants sont indiquées le long des pics, avec les significations suivantes :

	A	Ala	Alanine
	B	Asx	Asp ou Asn
	C	Cys	Cystéine ou demi-cystine
	D	Asp	Acide aspartique
20	E	Glu	Acide glutamique
	F	Phe	Phénylalanine
	G	Gly	Glycine
	H	His	Histidine
	I	Ile	Isoleucine
25	K	Lys	lysine
	L	Leu	Leucine
	M	Met	Méthionine
	N	Asn	Asparagine
	O	PCA	Gln cyclisé
30	P	Pro	Proline
	Q	Gln	Glutamine
	R	Arg	Arginine
	S	Ser	Sérine
	T	Thr	Thréonine
35	V	Val	Valine

- 19 -

W Trp Tryptophane
 X () inconnu
 Y Tyr Tyrosine
 Z Glx Glu ou Gln

5 Les pics ont été numérotés en fonction de la position des peptides dans la totalité de la séquence représentée dans la Figure 1, dans laquelle lesdits peptides sont désignés par T₁, T₂, T₃, T₄, T₅, T₆, T₇, T₈, T₉, T₁₀, T₁₁ (T = digestion par la trypsine). Deux peptides supplémentaires (CT
 10 8) ont été obtenus, probablement par action de la chymotrypsine contenue dans la trypsine.

Les séquences indiquées à chacun des pics de la Figure 2 sont les suivantes :

CT₈:N.S.E.E.F.R=Asn.Ser.Glu.Glu.Arg.
 15 T₃:A.G.Q.N.L.T.V.=Ala.Gly.Gln.Asn.Leu.Thr.Val.
 CT₈:F.N.S.E.E.F.R.=Phe.Asn.Ser.Glu.Glu.Phe.Arg.
 T₁₀:Y.M.H.F.E.G.E.A.R.=Tyr.Met.His.Phe.Glu.Gly
 Glu.Alala.Arg.
 T₆:E.G.G.F.P.=Glu.Gly.Gly.Phe.Pro
 20 T₁₁:I.Y.S.I.E.I.=Ile.Tyr.Ser.Ile.Glu.Ile
 T₁₁:I.Y.S.I.E.I.K.=Ile.Tyr.Ser.Ile.Glu.Ile.Lys.
 T₅:F.D.A.H.G.D.Q.Q.A.V.V.V.N.S.F.Q.G.G.N=Phe.Asp.
 Ala.His.Gly.Asp.Gln.Gln.Ala.Val.Val.Val.Asn.
 Ser.Phe.Gln.Gly.Gly.Asn.
 25 T₈:I.Q.I.T.F.N.S.E.E.F.R.=Ile.Gln.Ile.Thr.Phe.Asn.
 Ser.Glu.Glu.Phe.Arg.
 T₉:I.I.L.P.D.G.S.E.I.H.F.P.N.N.R.=Ile.Ile.Leu.Pro.
 Asp.Gly.Ser.Glu.Ile.His.Phe.Pro.Asn.Asn.Arg.
 T₄:G.V.P.S.I.D.S.T.N.F.A.I.N.V.G.N.S.A.E.D.L.A.L.
 30 H.I.N.P.R.=Gly.Val.Pro.Ser.Ile.Asp.Ser.Thr.Asn.
 Phe.Ala.Ile.Asn.Val.Gly.Asn.Ser.Ala.Glu.Asp.
 Leu.Ala.Leu.His.Ile.Asn.Pro.Arg.

c) Analyse des peptides résultant de la digestion par la protéase de Staphylococcus aureus.
 35 Des séquences supplémentaires de lectine et des sé-

- 20 -

quences en chevauchement ont été obtenues par analyse des peptides résultant de la digestion de lectine d'anguille électrique par la protéase extraite de *Staphylococcus aureus* qui, dans les conditions expérimentales mises en oeuvre, clive les protéines aux liaisons peptidiques Glu-X. Les peptides ont été séparés par HPLC avant d'analyser leur séquence à l'aide du séquenceur automatisé. Les peptides clivés par la protéase de *Staphylococcus aureus* sont désignés à la Figure 1 par SP₁, SP₂, SP₃, SP₄.

Les analyses des séquences des peptides obtenus aussi bien par clivage chimique que par clivages protéolytiques, ont permis d'établir la totalité de la séquence en amino-acides de la lectine fixant le β -D-galactoside, isolée de l'anguille électrique et plus de 60 % de celle de la lectine placentaire humaine. L'alignement des peptides tel qu'il est représenté à la Figure 3 annexée, pour la lectine de poulet, d'anguille électrique, de placenta humain (Hum.p.), de poumon humain (Hum.l.) et d'hépatome humain (Hum. Hep. 1 et 2), est basé sur les homologies importantes que présentent les autres lectines avec la protéine de 14KD qui fixe le β -D-galactoside, isolée d'embryon de poulet.

2. Structures secondaires des lectines

Les paramètres caractéristiques des structures secondaires des lectines ont été calculés sur des lectines de poulet et d'anguille, à l'aide d'un logiciel fourni par le groupe d'informatique appliquée au génie génétique, de l'Université de Wisconsin, et d'un ordinateur "Microwax II". Les résultats de ces calculs sont représentés à la Figure 4 annexée qui représente la propension des lectines à former des structures en feuillets plissés β et qui représente également leurs profils d'hydropathie. Les deux courbes supérieures - qui représentent les structures en feuillets plissés β en fonction du nombre de résidus d'acides-amino - ont été calculées à l'aide de la méthode de CHOU & FASMAN [BIOCHEMISTRY, 13, 211-222] et les deux courbes inférieures - qui représen-

- 21 -

tent l'hydropathie, en fonction du nombre de résidus d'amino-acides - ont été obtenues à l'aide de l'échelle d'hydropathie de KYTE & DOOLITTLE [J. MOL. BIOL., 157, 105-132].

Dans la Figure 4, les parties de chacune des courbes qui se trouvent au-dessus de la ligne de seuil dont la valeur est de 1,00, indiquent les résidus d'amino-acides probablement impliqués dans les structures en feuillets plissés β . Il s'ensuit que les lectines de poulet et d'anguille semblent être toutes deux composées d'au moins 10 feuillets plissés β qui sont tous constitués par des résidus d'amino-acides dans des positions équivalentes dans les deux protéines.

Il en est de même des profils d'hydropathie dont la similarité est très grande dans les deux protéines.

Les séquences d'amino-acides qui ont pu être établies, de même que la propension des lectines à former des feuillets plissés β et leurs profils d'hydropathie, tels que représentés à la Fig. 4, mettent en évidence l'homologie de structure des lectines d'animaux vertébrés. Les lectines de poulet et d'anguille comportent 51 résidus identiques sur les 130 positions qui ont été comparées, ce qui correspond à une homologie de 39 %. Les résidus identiques sont répartis sur toute la longueur des protéines, sauf sur le dernier tiers des chaînes, qui présente beaucoup moins de similarités que le reste des polypeptides.

Outre les 51 résidus identiques, 27 positions sont occupées par des résidus homologues, codés par des codons qui ne diffèrent que par un seul nucléotide. Le peptide terminal bloqué sur l'azote se compose d'une séquence Ser-Met N acétylée. L'analyse des peptides résultant du clivage par le CNBr dans un mélange HFBA/acide formique a permis d'assigner au tryptophane la position 70. Cette position 70 assignée au résidu tryptophane est corroborée par le fait que toutes les séquences de lectines représentées à la Fig. 3 présentent la même zone 70-76.

En outre, l'alignement des peptides tel que repré-

- 22 -

senté aux figures 1 et 3 est corroboré par la similarité des zones formant des feuillets plissés β et des profils d'hydrophatie, en particulier des séquences de poulet et d'anguille.

La comparaison entre les lectines de poulet et de placenta humain fait apparaître 59 résidus identiques sur 111 positions comparées. En fait, plusieurs séquences de peptides sont identiques dans les deux protéines : les séquences 29-33, 35-40, 45-51, 53-56, 70-76, 78-82, 89-91, 109-111 et 125-127.

La comparaison entre la lectine d'anguille et la lectine de placenta humain fait apparaître 47 résidus identiques sur 111 positions comparées.

La comparaison entre les séquences partielles des quatre lectines d'origine humaine représentées à la Figure 3, fait apparaître des homologues significatives : 50 résidus sur 54 positions comparables (93 % d'homologie) sont identiques dans les lectines de poumon et de placenta humains, alors qu'on ne trouve que 41 % d'homologie entre la lectine de placenta humain et le produit du clone de cDNA d'hépatome humain 1 (42 résidus sur les 103 résidus comparés). Ces résultats indiquent qu'au moins quatre gènes différents codant pour les lectines qui fixent le β -D-galactoside, peuvent être présents dans le génome humain et qu'ils ont une origine commune qui a pour conséquence qu'on retrouve dans les séquences peptidiques des lectines de différentes origines animales, les mêmes déterminants structuraux essentiels, tels, notamment, que le site de fixation du β -D-galactoside qui se situerait, au moins en partie, au niveau des positions 70-76. Cette séquence peptidique contient un résidu tryptophane et deux résidus acide glutamique, respectivement en positions 70, 73 et 76.

EXEMPLE V - Préparation, par voie de synthèse, d'une séquence d'acides-amino correspondant à au moins une partie d'une lectine fixant le β -D-galactoside

Les peptides séquencés comme décrit à l'Exemple IV

- 23 -

qui précède, ont été synthétisés en mettant en oeuvre la méthode en phase solide de MERRIFIELD [cf. J. AM. CHEM. SOC. (1963), 85, 2194].

La synthèse complète de la lectine d'anguille électrique et de la lectine de placenta humain permettra une meilleure approche des propriétés et de la constitution des membranes des lymphocytes et la synthèse de la seconde pourra permettre de disposer d'une source entièrement synthétique pour la préparation d'un agent thérapeutique, immunostimulant et immunosuppresseur, de grande valeur.

EXEMPLE VI - Préparation d'anticorps polyclonaux contre la lectine placentaire humaine.

Préparation d'anticorps polyclonaux contre la lectine placentaire humaine.

- 15 - on a injecté à des lapins, au temps zéro, 50 µg de lectine placentaire purifiée par chromatographie d'affinité, en adjuvant complet de Freund en injection intra-dermique multi points.
- la deuxième immunisation a eu lieu 15 jours plus tard avec
- 20 50 µg de lectine en adjuvant incomplet de Freund en injection sous-cutanée.
- la troisième immunisation a eu lieu 15 jours plus tard avec 50 µg de lectine en adjuvant incomplet de Freund en injection sous-cutanée.
- 25 - les saignées ont été effectuées régulièrement toutes les 3 semaines.
- A partir de ces sérums, les fractions immunoglobuliniques ont été purifiées par DEAE puis testées pour déterminer leur activité anticorps par la méthode ELISA et par immunoblot.
- 30 **Essai de réponse polyclonale par la méthode ELISA :**
 - la lectine diluée dans le tampon NaCl 8 mercaptoéthanol à la concentration de 5 µg/ml, est fixée sur une immunoplaque Nunc comportant 96 puits, à raison de 50 µl par puits pendant 1 h à 30°C.
- 35 - 3 lavages en PBS 1 % lait écrémé 0,1 % Tween (PLT).

- 24 -

- Saturation 1 h 30° C.
- 50 µl par puits des différents antisérums et à différentes dilutions (en PLT) sont distribués sur la plaque et incubés 1 h à 30° C.
- 5 - 3 lavages en PLT.
- 50 µl par puits de sérum chèvre anti-lapin couplé à la peroxydase dilué au 1/1000 GAR-pox.
- 3 lavages en PBS.
- Révélation par 100 µl de substrat ABTS à 1 % dans du tampon
- 10 acétique pH 4,7 contenant 0,2 % d'H₂O₂ 30 vol.
- L'absorption est mesurée à une longueur d'onde de 405 nm dans un analyseur Titertek Multiskan.
- Les résultats obtenus sont représentés à la Fig. 6 annexée.
- Essai de réponse polyclonale mis en évidence par Immunoblot
- 15 - On réalise une électrophorèse en SDS-PAGE qui consiste en la migration de la lectine purifiée, en présence de 8 mercaptoéthanol à raison de 8µg par puits, sur gel d'acrylamide à 15 % contenant 0,1 % de SDS. 250 volts 4 h.
- On transfère ensuite sur nitrocellulose, à 30 volts pendant
- 20 dant 16 h.
- On réalise la saturation en PLT pendant 5 h 4°C.
- Des bandes de 1 cm de large sont découpées dans la nitrocellulose.
- On fait incubé des antisérums.
- 25 - On lave au PLT.
- GAR-pox 1/1000 (2 ml/bande).
- Lavages PBS Triton 0,1 %.
- La révélation est réalisée au chloronaphtol ;
- L'immunoblot est représenté à la Fig. 7 annexée qui montre
- 30 que les antisérums de lapin (fractions IgG purifiées) réagissent avec la lectine : la révélation met en évidence une bande de poids moléculaire 14 KD.
- Dans la Fig. 7, les schéma des incubations sont les suivants :
- 35 - bande n° 1 : liquide physiologique NaCl 0,15 M, phosphate

- 25 -

de sodium 0,01 M, pH 7,4 (PBS).

- bande n° 2 : sérum normal souris au 1/50.
- bande n° 3 : sérum préfusion souris anti-ELH 1/50.
- bande n° 4 : sérum souris anti-ELH 1/50.

5 **EXEMPLE VII - Préparation d'anticorps monoclonaux
anti-lectine placentaire humaine.**

1. Immunisation

On a immunisé des souris femelles Balb/c en leur injectant une fois par semaine pendant trois semaines consécutives, par voie intra-veineuse, 100 µg de lectine purifiée.
Après une période de repos de trois mois, les souris ont eu un rappel par voie intra-veineuse avec la même quantité de lectine trois jours avant le prélèvement des splénocytes pour la fusion.

15 2. Fusion

Des cellules de myélome de souris NS 1 sont utilisées pour la fusion. Elles ont été sélectionnées pour leur sensibilité à l'aminoptérine et cultivées sur le milieu RPMI contenant 10 % de sérum de veau foetal, 2mM de glutamine, 1mM de pyruvate de sodium, 100 UI/ml de pénicilline et 100 µg/ml de streptomycine.

Les splénocytes ont été dispersés par injection du milieu RPMI exempt de sérum dans la rate des souris hyperimmunisées et lavés trois fois dans du milieu RPMI avant fusion.

Les cellules de myélome et les splénocytes ont été ensuite fusionnés dans un rapport de une cellule de myélome pour 10 splénocytes, en présence de 41 % de polyéthylèneglycol d'un poids de 1500 (Merck) selon la méthode de KOHLER et MILSTEIN (Nature, 256, 495-497, 1975), puis lavées dans le milieu RPMI et remises en suspension dans 100 ml du milieu RPMI complet. Les cellules ont ensuite été redistribuées dans des microplaques Nunclon (24 puits par plaque) à raison de 1ml/puits contenant $2,2 \cdot 10^5$ cellules.
Après 24 heures, on a ajouté 1ml/puits de milieu constitué du

- 26 -

milieu RPMI complet contenant 0,1 mM d'hypoxanthine, 0,4 M d'aminoptérine et 16 μ m de thymidine. Des parties aliquotes de milieu sélectif ont été remplacées les 3e, 6e et 10e jours après la fusion. Après 15 jours, les hybridomes survivants
5 ont été cultivés sur le milieu RPMI complet, complété avec de l'hypoxanthine et de la thymidine et, 15 jours après la fusion, on a recherché la présence d'anticorps anti-lectine placentaire humaine dans les surnageants de culture. Les clones ont été ensuite cultivés progressivement sur le milieu
10 RPMI complet normal.

Les cultures positives ont été clonées par la méthode des dilutions limites selon OI V.T. et HERZENBERG, L.A. 1980 Immunoglobulin-producing hybrid cell lines, in "Selected Methods in Cellular Immunology" (Eds. Mishell, R.B. and
15 Shrigi, S.M., p. 351, Fillman, San Francisco).

Les cellules ont été redistribuées dans les puits d'une microplaque Nunclon, à raison de 0,5 cellule en moyenne par puits, avec 3.10^5 thymocytes à titre de cellules nutritives. Après 10 jours, les puits contenant des clones uniques
20 ont été sélectionnés et 5 jours plus tard, les surnageants ont été testés pour déterminer la présence d'anticorps anti-levures.

Trois clones issus d'une culture primaire positive, ont été sélectionnés et injectés à des souris Balb/c pour obtenir de grandes quantités d'anticorps. A cet effet, des souris femelles âgées Balb/c ont été stimulées par une injection intrapéritonéale de 0,3 ml de tétraméthyl-pentadécane. Après
25 4 jours, 20 millions de cellules hybrides ont été injectées aux souris. Au bout de 15 jours, les fluides d'ascites ont
30 été récoltés et leur activité anti-levure a été testée.

EXEMPLE VIII - Clonage de sondes oligonucléotidiques.

Le clonage a été réalisé en synthétisant deux sondes oligonucléotidiques basées sur les séquences peptidiques de la lectine placentaire humaine, respectivement entre les résidus 48 et 56 et 70 et 82.
35

- 27 -

4 espèces moléculaires majeures ont été identifiées dans une banque génomique par la méthode d'hybridation de SOUTHERN et leur clonage réalisé.

De façon plus spécifique, on réalise l'hybridation
5 de l'ADN des cellules A₄³¹ digéré par EcoRI, et de l'ADN de phage λ digéré par HINDIII avec la sonde P38 marquée au ³²p.

L'activité spécifique de la sonde P38 est de 3.10⁵ cpm/pmole.

La figure 7 représente l'hybridation de SOUTHERN
10 réalisée dans les conditions ci-dessus.

1 : ADN de phage λ : 10 μ g par puits

2 : ADN A₄³¹ : 10 μ g par puits.

**EXEMPLE IX - Applications des anticorps polyclonaux et
monoclonaux anti-lectine placentaire humaine.**

15 1. Les anticorps polyclonaux préparés comme décrit à l'Exemple VI ci-dessus, contre la lectine placentaire humaine ont été utilisés pour révéler la présence et la taille de la lectine placentaire dans un mélange de protéines soumis à électrophorèse en gel de polyacrylamide suivie de transfert
20 électrophorétique sur membrane de nitrate de cellulose et d'absorption des anticorps (technique dite "d'immunoblot"), par la technique de l'immunoblot, qui est réalisée comme décrit plus haut à l'Exemple VI.

2. Les anticorps polyclonaux, préparés comme décrit
25 à l'Exemple VI ci-dessus, contre la lectine placentaire humaine, ont été utilisés pour détecter la présence de lectine à la surface de certaines cellules lymphoïdes aussi bien normales que tumorales.

Les résultats obtenus à ce jour suggèrent que le
30 taux de lectine exprimée à la surface de cellules tumorales varie en fonction de la capacité de ces cellules d'essaimer et de former des métastases.

Ces anticorps polyclonaux constituent, en conséquence, des agents de détection efficaces de la présence de mé-
35 tastases.

- 28 -

3. Les anticorps polyclonaux ou monoclonaux anti-
lectine constituent, en outre, des agents de diagnostic uti-
les pour la détermination de la capacité métastatique des tu-
meurs en utilisant l'une des techniques connues telles qu'im-
munofluorescence et ELISA, notamment.

4. Les anticorps polyclonaux et monoclonaux anti-
lectine constituent en outre des produits thérapeutiques de
valeur, en ce qu'ils peuvent être utilisés en tant que vec-
teurs pour cibler des toxines ou des enzymes sur des cellules
tumorales exprimant la lectine à leur surface.

Ainsi que cela ressort de ce qui précède, l'inven-
tion ne se limite nullement à ceux de ses modes de mise en
oeuvre, de réalisation et d'application qui viennent d'être
décrits de façon plus explicite ; elle en embrasse au con-
traire toutes les variantes qui peuvent venir à l'esprit du
technicien en la matière, sans s'écarter du cadre, ni de la
portée de la présente invention.

- 29 -

REVENDICATIONS

1°) Séquence d'acides-amino caractérisée en ce qu'elle correspond à au moins une partie de la séquence des lectines fixant le β -D-galactoside et en ce qu'elle comprend
 5 un squelette d'acides-amino qui est composé d'au moins les acides-amino suivants, dans les positions suivantes :

	2	14	16	19	23	32
	sérine	lysine	glycine	leucine	glycine	phénylalanine
	35		37	43	45	46
	asparagine	glycine	leucine	leucine	histidine	
10	48	49	50	51		
	asparagine	proline	arginine	phénylalanine	acide	
	56	61	63	64	70	
	aspartique	valine	asparagine	serine	tryptophane	
	71	73	75	76	81	
	glycine	glutamine	arginine	glutamine	phénylalanine	
	84	92	93	104	105	
	glycine	thréonine	phénylalanine	leucine	proline	
15	106	107	112	113		
	acide aspartique	glycine	phénylalanine	proline		
	114					
	asparagine.					

2°) Séquence d'acides-amino selon la revendication 1, caractérisée en ce que son squelette comprend en outre les
 20 acides-amino suivants, dans les positions suivantes :

	3	5	28	53	54
	asparagine	valine	acide aspartique	alanine	histidine
	55	67	68	72	74
	glycine	glycine	glycine	thréonine	glutamine
	91	102	103	109	
25	isoleucine	isoleucine	isoleucine	acide glutamique	
	132	133			
	isoleucine	lysine			

3°) Séquence d'acides-amino selon la revendication 1, caractérisée en ce que son squelette comprend en outre les acides-amino suivants, dans les positions suivantes :

30

35

- 30 -

- 8 10 26 27 29 30
 thréonine asparagine alanine proline alanine lysine
 31 32 36 38 39 40
 sérine valine leucine lysine acide aspartique sérine
 47 53 54 55 58
 5 phénylalanine alanine histidine glycine asparagine
 60 62 72 74 78 80
 isoleucine cystéine thréonine glutamine valine proline
 82 91 110 115 116
 glutamine isoleucine phénylalanine arginine leucine
 118 128 129
 leucine glycine acide aspartique
- 10 4°) Séquence d'acido-amino selon la revendication
 1, caractérisée en ce que son squelette comprend en outre
 les acido-amino suivants, dans les positions suivantes :
- 4 6 18 20 21 22
 glycine valine glutamine thréonine valine lysine acide
 52 53 54 55 72 74
 15 aspartique alanine histidine glycine thréonine glutamine
 80 91 96
 proline isoleucine asparagine
- 5°) Séquence d'acido-amino selon la revendication
 1, caractérisée en ce que son squelette comprend en outre les
 acido-amino suivants, dans les positions suivantes :
- 20 28 67 68 74 79
 acide aspartique glycine glycine glutamine phénylalanine
- 6°) Séquence d'acido-amino selon la revendication
 1, caractérisée en ce que son squelette comprend en outre les
 acido-amino suivants, dans les positions suivantes :
- 25 26 27 29 30 31 33 36
 alanine proline alanine lysine sérine valine leucine
 38 39 40 74 78
 lysine acide aspartique sérine glutamine valine
 79 109 110 115 116
 phénylalanine glutamine phénylalanine arginine leucine
 118 123
 leucine tyrosine
- 7°) Séquence d'acido-amino selon la revendication
 30 1, caractérisée en ce qu'elle comprend au moins les 129
 acido-amino suivants, qui sont présents selon la même
 séquence dans la lectine de l'anguille électrique :

- 31 -

1 10
 (SER MET) ASN GLY VAL VAL ASP GLU ARG MET SER PHE LYS ALA
 20
 GLY GLN ASN LEU THR VAL LYS GLY VAL PRO SER ILE ASP SER THR
 30 40
 5 ASN PHE ALA ILE ASN VAL GLY ASN SER ALA GLU ASP LEU ALA LEU
 50
 HIS ILE ASN PRO ARG PHE ASP ALA HIS GLY ASP GLN GLN ALA VAL
 60 70
 VAL VAL ASN SER PHE GLN GLY GLY ASN (TRP)GLY(THR) GLU GLN(ARG
 80
 GLU GLY GLY PHE PRO PHE LYS GLN GLY GLU ASP PHE LYS ILE GLN
 90 100
 10 ILE THR PHE ASN SER GLU GLU PHE ARG ILE ILE LEU PRO ASP GLY
 110
 SER GLU ILE HIS PHE PRO ASN ASN ARG TYR MET HIS PHE GLU GLY
 120
 GLU ALA ARG ILE TYR SER ILE GLU ILE LYS...

8°) Séquence d'acides-amino selon la revendication 1
 caractérisée en ce qu'elle comprend au moins les acides-amino
 15 suivants, qui se présentent selon la même séquence dans la
 lectine de placenta humain :

1 4 6 8 10 11
 SER() ASN TYR VAL SER() THR() ASN
 18 20 21 23 26 28
 () ILE GLY GLU VAL ALA PRO ASP ALA
 30 31 34 35 36 40 41 42 43
 20 LYS SER PHE VAL LEU ASN LEU GLY LYS ASP SER ASN ASN LEU CYS
 45 46 48 50 51 53 54 55 56
 LEU HIS PHE ASN PRO ARG PHE ASN ALA HIS GLY ASP ALA ASN THR
 60 61 67 68 70 71 72 74
 ILE VAL LYS ASN SER () ASP GLY GLY ALA TRP GLY THR GLU GLN
 78 80 81 82 83 84 85 86 87 88
 ARG GLU ALA VAL PHE PRO PHE GLN PRO GLY SER VAL ALA GLU
 89 90 91 92 93 94 95 96 97 100 101 102 103
 25 VAL() ILE THR PHE ASP GLN ALA ASN LEU LEU VAL ILE ILE
 104 105 107 108 109 110 111 112 113 114 115 116 118
 LEU PRO ASP GLY LEU GLU PHE LYS PHE PRO ASN ARG LEU ASN LEU
 119 120 121 123 125 128 130 131 132 133
 GLU ALA ILE ASN LEU MET ALA ALA ASP GLY ASP PHE LYS ILE LYS
 134 135

30 9°) Séquence d'acides-amino selon la revendication
 7, caractérisée en ce que lesdits acides-amino entrent dans
 la composition des peptides suivants :

- (1) Asn - Ser - Glu - Glu - Phe - Arg
- (2) Ala - Gly - Gln - Asn - Leu - Thr - Val
- 35 (3) Phe - Asn - Ser - Glu - Glu - Phe - Arg

- 32 -

- (4) Tyr - Met - His - Phe - Glu - Gly - Glu - Ala - Arg
(5) Glu - Gly - Gly - Phe - Pro
(6) Ile - Tyr - Ser - Ile - Glu - Ile
(7) Ile - Tyr - Ser - Ile - Glu - Ile - Lys
5 (8) Phe - Asp - Ala - His - Gly - Asp - Gln - Gln - Ala -
Val - Val - Val - Asn - Ser - Phe - Gln - Gln - Asn
(9) Ile - Gln - Ile - Thr - Phe - Asn - Ser - Glu - Glu -
Phe - Arg
(10) Ile - Ile - Leu - Pro - Asp - Gly - Ser - Glu - Ile -
10 His - Phe - Pro - Asn - Asn - Arg
(11) Gly - Val - Pro - Ser - Ile - Asp - Ser - Thr - Asn -
Phe - Ala - Ile - Asn - Val - Gly - Asn - Ser - Ala -
Glu - Asp - Leu - Ala - Leu - His - Ile - Asn - Pro -
Arg
15 (12) Gly(Thr) - Glu - Gln.
10°) Peptide caractérisé en ce qu'il présente la
composition suivante : Asn-Ser-Glu-Glu-Phe-Arg.
11°) Peptide caractérisé en ce qu'il présente la
composition suivante : Ala-Glu-Gln-Asn-Leu-Thr-Val.
20 12°) Peptide caractérisé en ce qu'il présente la
composition suivante : Phe-Asn-Ser-Glu-Glu-Phe-Arg.
13°) Peptide caractérisé en ce qu'il présente la
composition suivante : Tyr-Met-His-Phe-Glu-Gly-Glu-Ala-Arg.
14°) Peptide caractérisé en ce qu'il présente la
25 composition suivante : Glu-Gly-Gly-Phe-Pro.
15°) Peptide caractérisé en ce qu'il présente la
composition suivante : Ile-Tyr-Ser-Ile-Glu-Ile.
16°) Peptide caractérisé en ce qu'il présente la
composition suivante : Ile-Tyr-Ser-Ile-Glu-Ile-Lys.
30 17°) Peptide caractérisé en ce qu'il présente la
composition suivante : Phe-Asp-Ala-His-Gly-Asp-Gln-Gln-Ala-
Val-Val-Val-Asn-Ser-Phe-Gln-Gln-Asn.
18°) Peptide caractérisé en ce qu'il présente la
composition suivante : Ile-Gln-Ile-Thr-Phe-Asn-Ser-Glu-Glu-
35 Phe-Arg.

- 33 -

19°) Peptide caractérisé en ce qu'il présente la composition suivante : Ile-Ile-Leu-Pro-Asp-Gly-Ser-Glu-Ile-His-Phe-Pro-Asn-Asn-Arg.

20°) Peptide caractérisé en ce qu'il présente la composition suivante : Gly-Val-Pro-Ser-Ile-Asp-Ser-Thr-Asn-Phe-Ala-Ile-Asn-Val-Gly-Asn-Ser-Ala-Glu-Asp-Leu-Ala-Leu-His-Ile-Asn-Pro-Arg.

21°) Peptide caractérisé en ce qu'il présente la composition suivante : Gly(Thr)-Glu-Gln.

22°) Séquence d'acides aminés selon l'une quelconque des revendications 1 à 9, caractérisée en ce qu'elle présente une structure en feuillets plissés β et en ce que ces feuillets sont au moins au nombre de 10, dans des positions correspondant à des positions d'acides aminés communs aux lectines de diverses origines.

23°) Séquence d'acides aminés selon l'une quelconque des revendications 1 à 9 et 22, caractérisée en ce qu'elle contient du tryptophane qui se trouve dans une position comprise entre la position 69 et la position 76 de la séquence, ainsi que deux résidus d'acide glutamique et en ce que la région 69-76 forme au moins en partie le site de fixation du β -D-galactoside.

24°) Séquence d'acides aminés selon l'une quelconque des revendications 1 à 9 et 22, 23, caractérisée en ce qu'elle contient au moins deux résidus cystéine ou demi-cystine qui se trouvent en positions 44 et 62.

25°) Séquence d'acides aminés selon l'une quelconque des revendications 1 à 9 et 22 à 24, caractérisée en ce qu'elle comporte un peptide terminal bloqué sur l'azote, qui se compose d'une séquence Ser-Met N-acétylée.

26°) Procédé de purification de lectines fixant le β -D-galactoside, à partir de tissus d'animaux vertébrés et notamment de l'anguille électrique et d'organes humains, tels que le placenta notamment, par homogénéisation et fractionnement des tissus animaux, puis isolement par

- 34 -

chromatographie d'affinité à l'aide d'une matrice de lactosyl-Sepharose, lequel procédé est caractérisé en ce que le tampon d'élution utilisé pour isoler les lectines est constitué par une solution saline pH 7,2, tamponnée par du phosphate, additionnée de lactose et de 2-mercaptoéthanol.

27°) Procédé de détermination des séquences - ou séquençage - d'amino-acides correspondant au moins à une partie de la séquence des lectines fixant le β -D-galactoside selon l'une quelconque des revendications 1 à 25, caractérisé par la mise en oeuvre d'une méthode de dégradation automatique par couplage de phénylisothiocyanate avec l'azote terminal du peptide à séquencer, clivage dudit résidu amino-terminal par cyclisation en milieu acide, et conversion du dérivé de thiazolinom formé, en un dérivé de phénylthiohydantoïne, laquelle méthode de dégradation est réalisée en présence de polybrène.

28°) Procédé d'obtention par voie de synthèse de séquences d'amino-acides correspondant au moins à une partie de la séquence de lectines fixant le β -D-galactoside, caractérisé en ce que ladite synthèse est réalisée en mettant en oeuvre une méthode dérivée de la méthode de BERGMAN et ZERVAS et utilisant des groupes protecteurs pour protéger les fonctions réactives des amino-acides à coupler, et des méthodes de couplage appropriées pour coupler entre eux les amino-acides protégés, pour former les séquences recherchées selon l'une quelconque des revendications 7 à 25.

29°) Anticorps polyclonaux anti-lectine placentaire humaine, caractérisés en ce qu'ils sont essentiellement constitués par des sérums obtenus à partir de sang d'animaux immunisés par injection de lectine purifiée par chromatographie d'affinité.

30°) Anticorps monoclonaux anti-lectine placentaire humaine, caractérisés en ce qu'ils sont constitués par des clones isolés à partir d'hybridomes obtenus par fusion de cellules tumorales appropriées, SP 2-O ou NS-1 notamment,

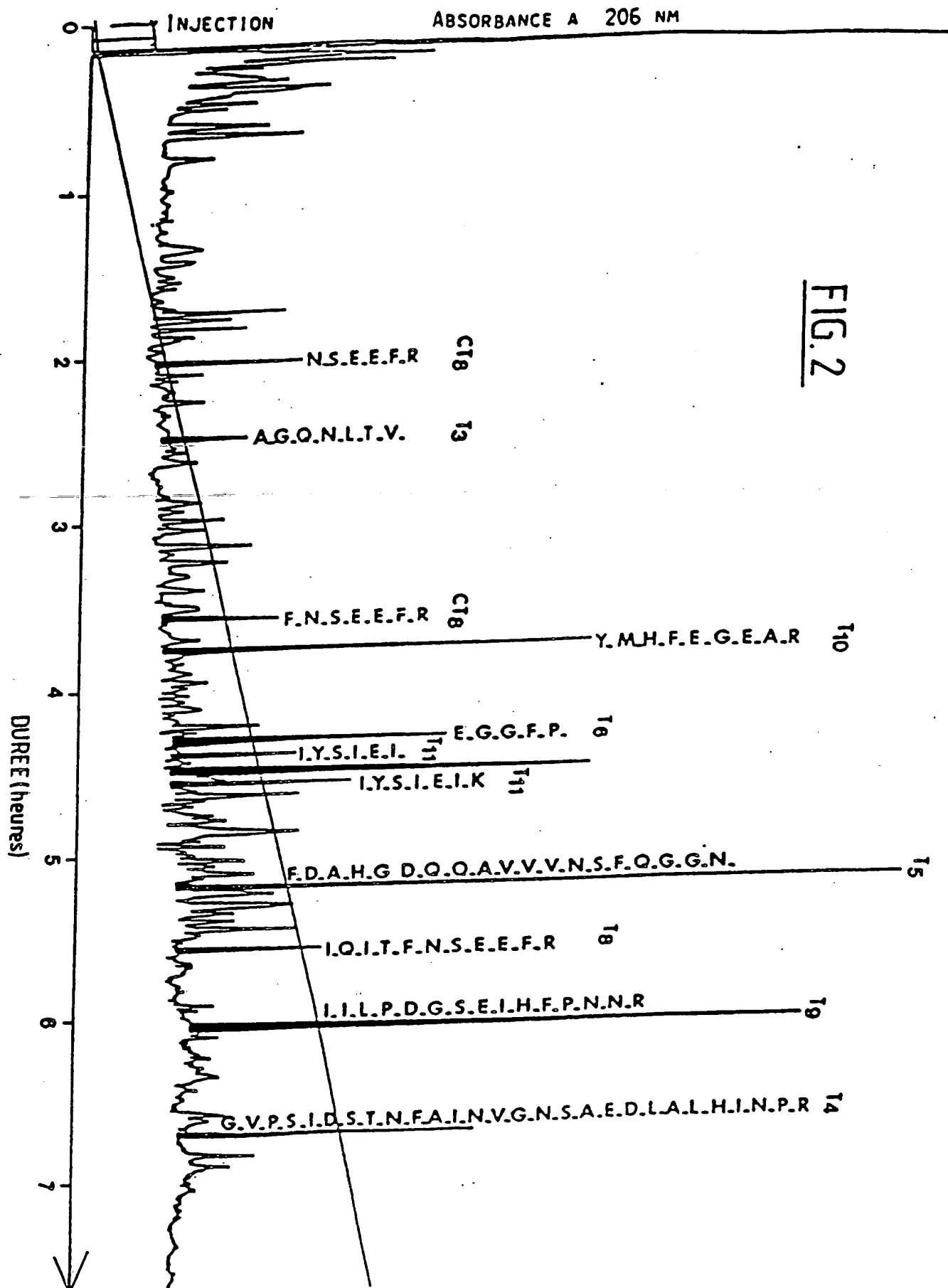
- 35 -

avec des splénocytes de souris immunisées contre la lectine de placenta humain convenablement purifiée.

31°) Agent de diagnostic d'affections tumorales, caractérisé en ce qu'il comprend des anticorps polyclonaux selon la revendication 29 et/ou des anticorps monoclonaux selon la revendication 30.

32°) Agent thérapeutique caractérisé en ce qu'il comprend des anticorps polyclonaux selon la revendication 29 et/ou des anticorps monoclonaux selon la revendication 30, éventuellement associés à des toxines et/ou des enzymes dirigées comme la lectine.

2/8



3 / 8

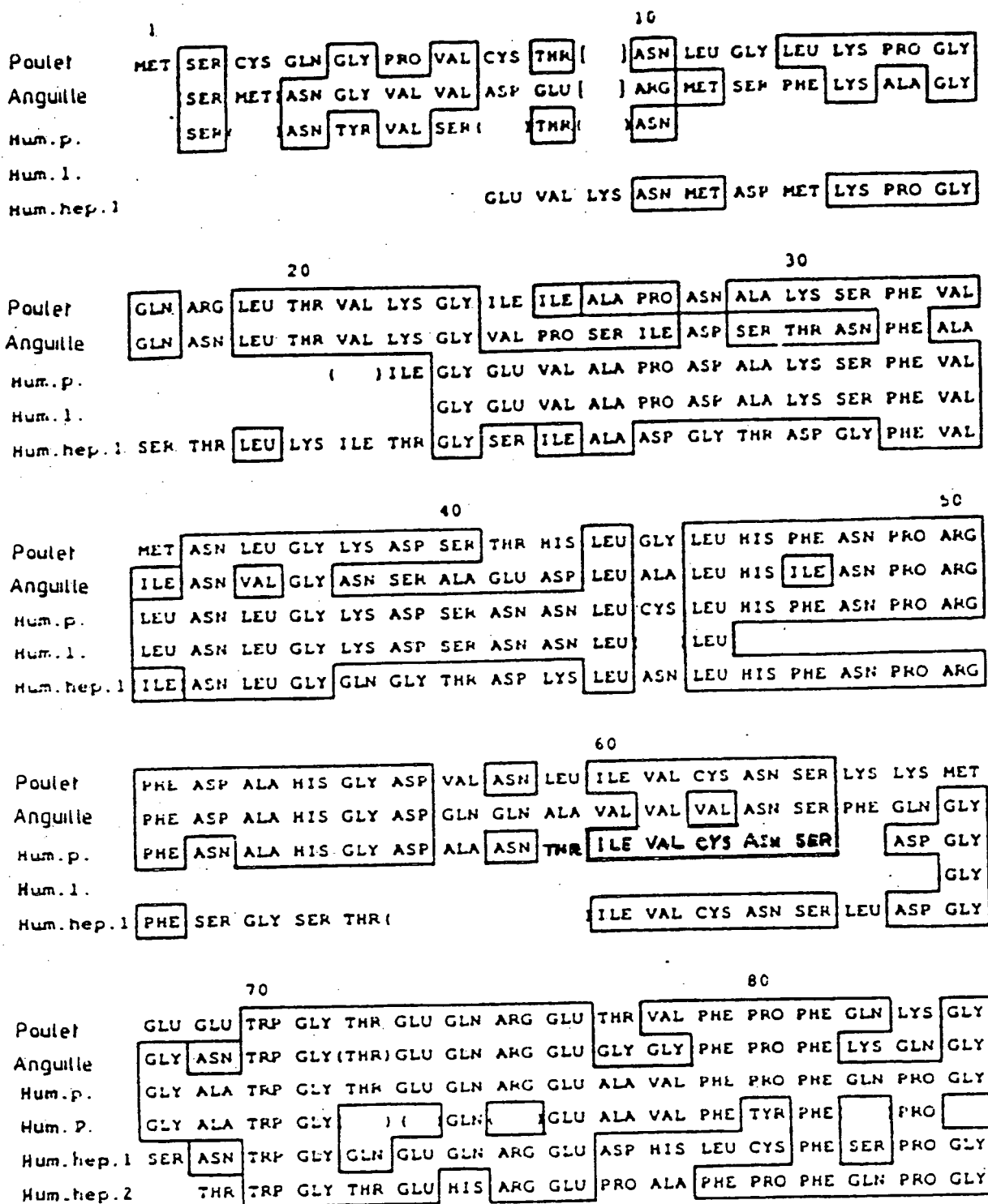


FIG. 3...

3'/8

90

Poulet	ALA	PRO	ILE	GLU	ILE	THR	PHE	SER	ILE	ASN	PRO	SER	ASP	LEU	THR
Anguille	GLU	ASP	PHE	LYS	ILE	GLN	ILE	THR	PHE	ASN	SER	GLU	GLU	PHE	ARG
Hum.p.	SER	VAL	ALA	GLU	VAL	ILE	THR	PHE	ASP	GLN	ALA	ASN	LEU	LEU	VAL
Hum.1.															
Hum.hep.1	SER	GLU	VAL	LYS	PHE	THR	VAL	THR	PHE	GLU	SER	ASP	LYS	PHE	LYS
Hum.hep.2	SER	ILE	THR	GLU	VAL	CYS	ILE	THR	PHE	ASP	GLN	ALA	ASP	LEU	THR

	100		110													
Poulet	VAL	HIS	LEU	PRO	GLY	HIS	GLN	PHE	SER	PHE	PRO	ASN	ARG	LEU	GLY	LEU
Anguille	ILE	ILE	LEU	PRO	ASP	GLY	SER	GLU	ILE	HIS	PHE	PRO	ASN	ASN(ARG)	TYR	MET
Hum.p.	ILE	ILE	LEU	PRO	ASP	GLY	LEU	GLU	PHE	LYS	PHE	PRO	ASN	ARG	LEU	ASN
Hum.1.		LEU	PRO		GLY	TYR	GLN	PHE(LYS)	PHE	PRO	ASN	ARG	LEU	ASN	LEU	
Hum.hep.1		LEU	PRO	ASP	GLY	HIS	GLU	LEU	THR	PHE	PRO	ASN	ARG	LEU	GLY	HIS
Hum.hep.2		LEU	PRO	ASP	GLY	HIS	GLU	PHE	LYS	PHE	PRO	ASN	ARG	LEU	ASN	MET

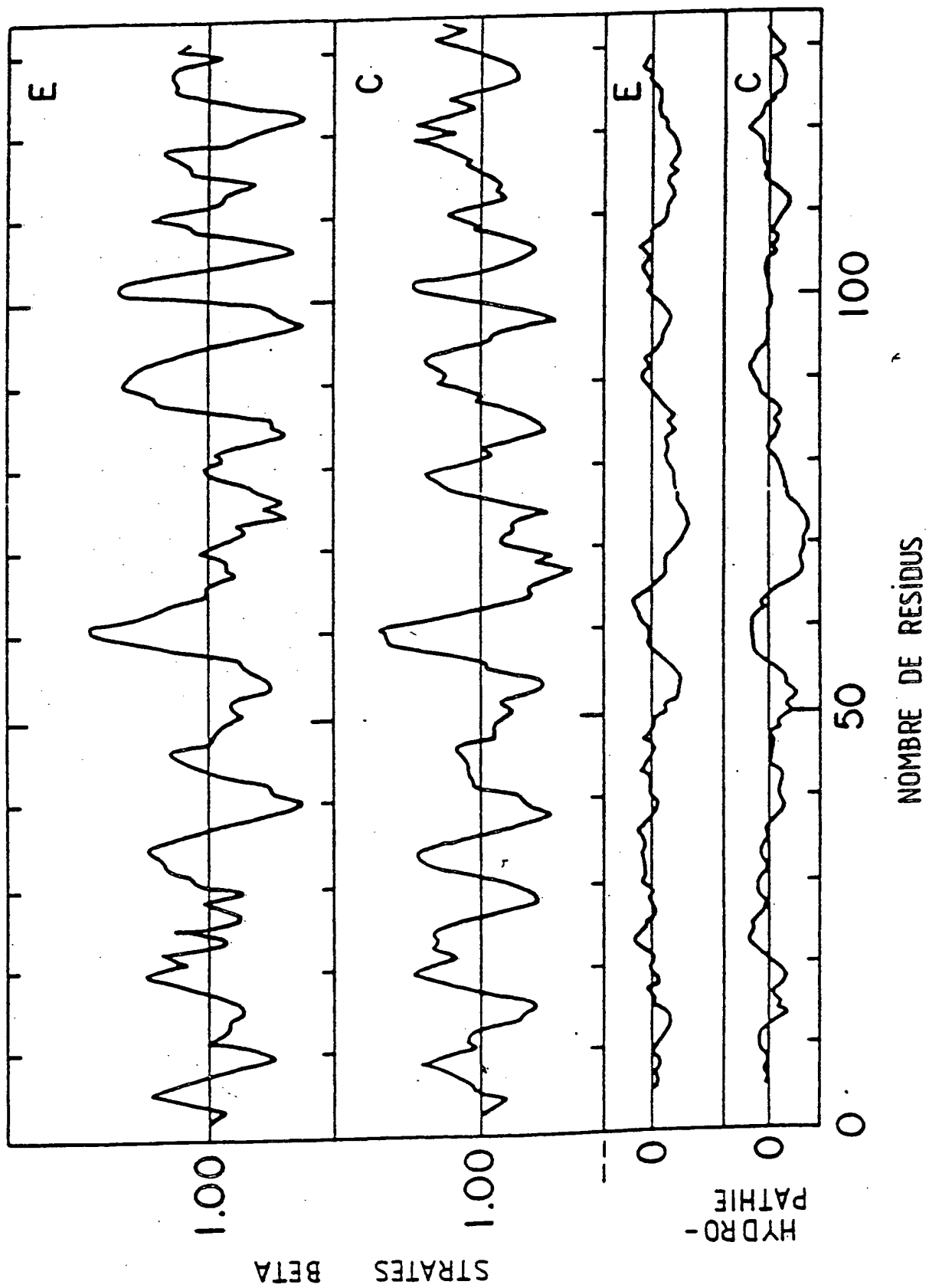
	120		130														
Poulet	SER	VAL	PHE	ASP	TYR	PHE	ASP	THR	HIS	GLY	ASP	PHE	THR	LEU	ARG	SER	VAL
Anguille	HIS	PHE	GLU	GLY	GLU	ALA	ARG	ILE	TYK	SER		ILE	GLU	ILE	LYS		
Hum.p.	GLU	ALA	ILE	ASN	LEU	MET	ALA	ALA	ASP	GLY	ASP	PHE	LYS	ILE	LYS		
Hum.1.	GLU	ALA	ILE	ASN	TYR												
Hum.hep.1	SER	HIS	LEU	SER	TYR	GLU	SER	ILE	ARG	GLY	GLY	PHE	ASN	MET	SER	SER	PHE
Hum.hep.2	GLU	ALA	ILE	ASN	TYR	MET	ALA	ALA	ASP	GLY	ASP	PHE	LYS	ILE	LYS	VAL	ARG

Poulet	SER	THR	GLU
Anguille			
Hum.p.			
Hum.D.			
Hum.hep.1	LYS	LEU	LYS
Hum.hep.2	GLY	LEU	

FIG_3 FIN

FEUILLE DE REMPLACEMENT

FIG. 4



5 / 8

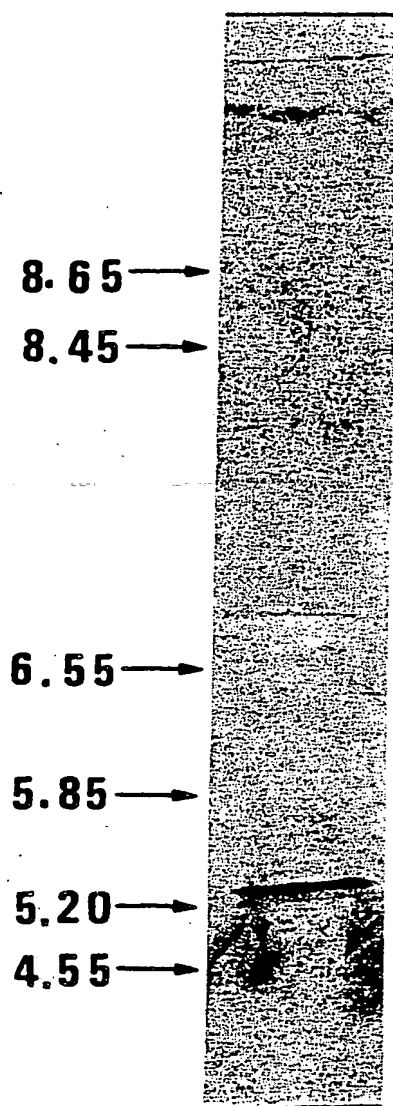
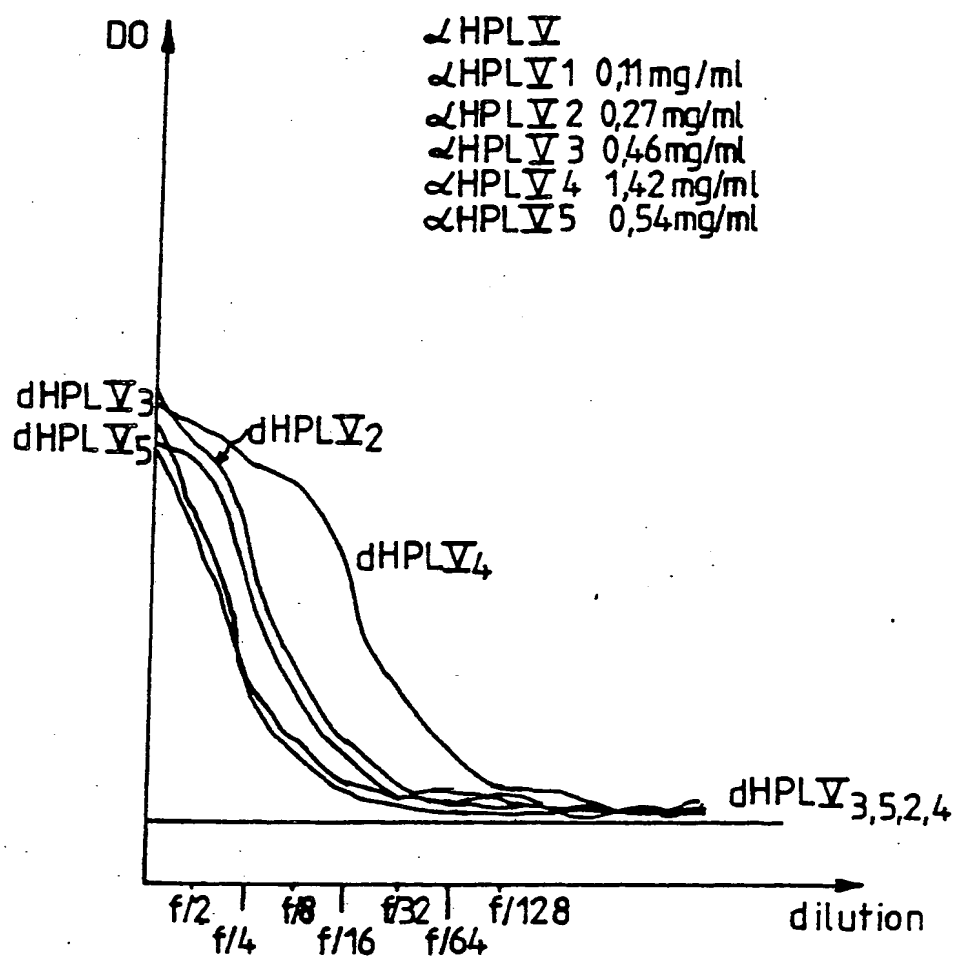
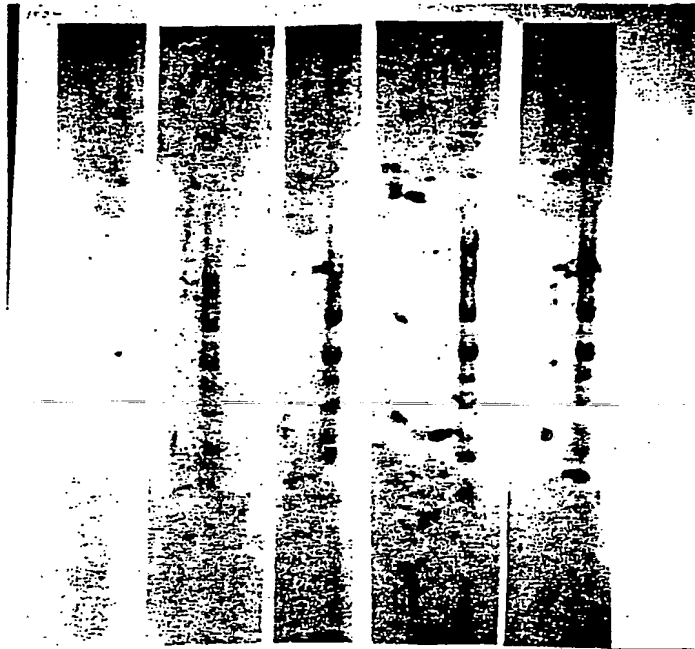


FIG. 5

FIG. 6



Hybridation de l'ADN des cellules A_4^{31} digéré par EcoRI et de l'ADN de phage λ digéré par HINDIII avec la sonde P38 marquée au ^{32}P . De gauche à droite la stringence des lavages diminue.

Activité spécifique P38 :

$3 \cdot 10^5$ cpm/pmole

1 : ADN de phage λ : 10 μ g/puits

2 : ADN A_4^{31} : 10 μ g/puits

8 / 8

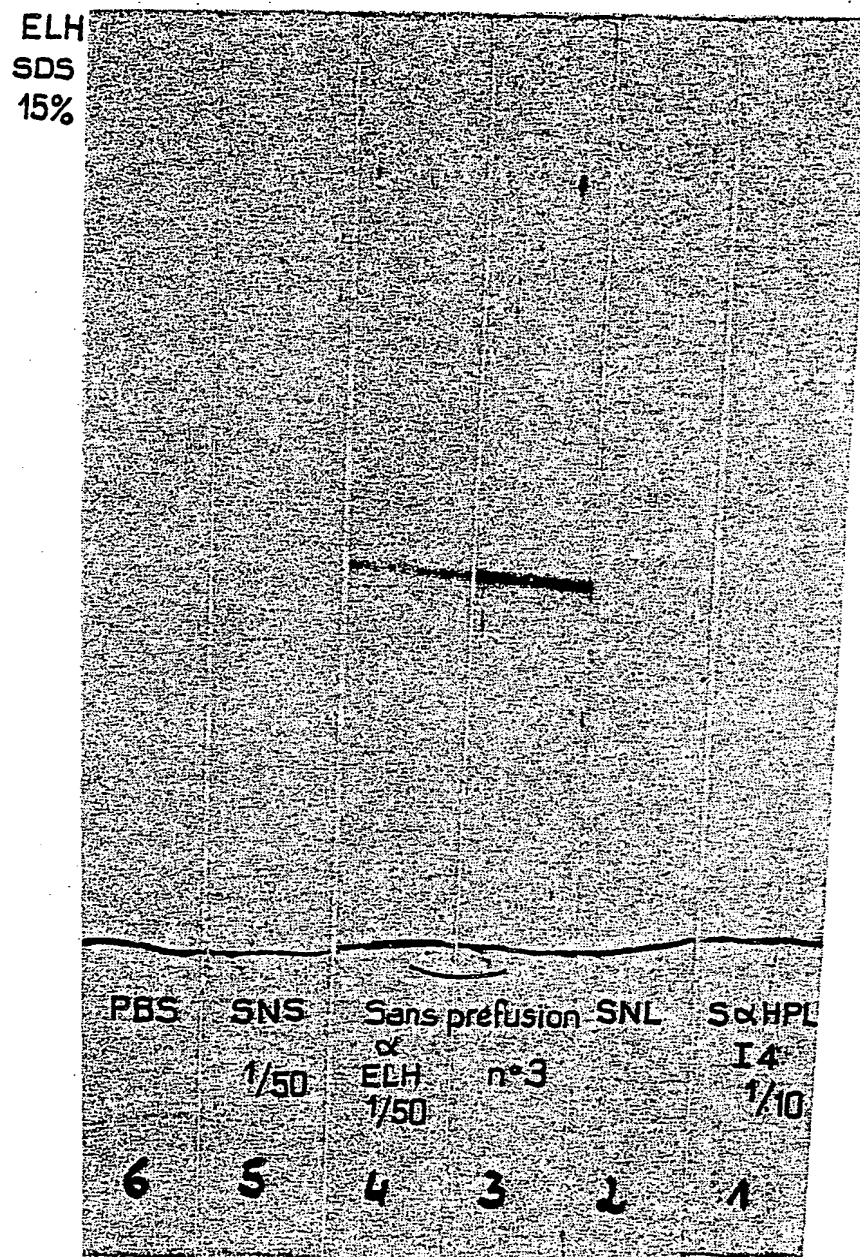


FIG. 8

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR88/00370

I. CLASSIFICATION F SUBJECT MATTER (If several classification symbols apply, indicate all) *		
According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC		
C 07 K 13/00; 7/06; 7/08; 7/10; C 07 K 3/20; A 61 K 39/395; Int.Cl ⁴ : G 01 N 33/577; // C 07 K 15/06; C 07 K 15/08		
II. FIELDS SEARCHED		
Minimum Documentation Searched ⁷		
Classification System	Classification Symbols	
Int.Cl ⁴	G 07 K 13/00; 7/00; C 07 K 3/00; A 61 K 39/00; G 01 N 33/00; C 07 K 15/00; A 61 K 37/00; 35/00	
Documentation Searched other than Minimum Documentation to the Extent that such Documents are Included in the Fields Searched *		
III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT *		
Category *	Citation of Document, ¹¹ with indication, where appropriate, of the relevant passages ¹²	Relevant to Claim No. ¹³
X	71st Annual Meeting of the Federation of American Societies for Experimental Biology", Washington, D.C. 29 March - 02 April 1987; Federation Proceedings, Vol. 46, No. 3 A.D. Strosberg et al.: "Extensive structural homology between lactose binding lectins from fish, birds, and mammals", page 947; see the whole article	1-8
X	Biological Abstracts, Vol. 79, No. 1, 1985, abstract No. 622 Philadelphia, US; J. Hirabayashi et al.: "Human placenta beta-galactoside-binding lectin: Purification and some properties", & Biochem Biophys Res. Commun 122 (3), 938-944, 1984, see abstract	26
A	Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 83, October 1986, The National Academy of Sciences (US) M.A. Gitt et al.: "Evidence that a human soluble beta-galactoside-binding lectin is encoded by a family of genes", pages 7603-7607; cited in the application	./.
<p>* Special categories of cited documents: ¹⁰</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step</p> <p>"Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.</p> <p>"&" document member of the same patent family</p>		
IV. CERTIFICATION		
Date of the Actual Completion of the International Search		Date of Mailing of this International Search Report
05 October 1988 (05.10.88)		04 November 1988 (04.11.88)
International Searching Authority		Signature of Authorized Officer
European Patent Office		

III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT (CONTINUED FROM THE SECOND SHEET)		
Category *	Citation of Document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to Claim No
X	Chemical Abstracts, Vol. 107, 1987 (Columbus Ohio, US) C. Southan et al.: "Amino acid sequence of beta-galactoside-binding bovine heart lectin. Member of a novel class of vertebrate proteins", see page 277, abstract No. 73017y & Febs Lett. 1987, 214(2), 301-4 -----	

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale N° PCT/FR 88/00370

I. CLASSEMENT DE L'INVENTION (si plusieurs symboles de classification sont applicables, les indiquer tous) ⁷		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB 4 C 07 K 13/00; 7/06; 7/08; 7/10; C 07 K 3/20; A 61 K 39/395; CIB: G 01 N 33/577; //C 07 K 15/06; C 07 K 15/08		
II. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTÉ		
Documentation minimale consultée ⁸		
Système de classification	Symboles de classification	
CIB ⁴	C 07 K 13/00; 7/00; C 07 K 3/00; A 61 K 39/00; G 01 N 33/00; C 07 K 15/00; A 61 K 37/00; 35/00	
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où de tels documents font partie des domaines sur lesquels la recherche a porté ⁹		
III. DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS ¹⁰		
Catégorie [*]	Identification des documents cités, ¹¹ avec indication, si nécessaire, des passages pertinents ¹²	N° des revendications visées ¹³
X	71st Annual Meeting of the Federation of American Societies for Experimental Biology", Washington, D.C. 29 mars - 2 avril 1987; Federation Proceedings, vol. 46, no. 3 A.D. Strosberg et al.: "Extensive structural homology between lactose binding lectins from fish, birds, and mammals", page 947, voir l'article en entier	1-8
X	Biological Abstracts, vol. 79, no. 1, 1985, résumé no. 622 Philadelphia, US; J. Hirabayashi et al.: "Human placenta beta-galactoside-binding lectin: Purification and some properties", & Biochem Biophys Res. Commun 122(3), 938-944, 1984, voir résumé	26
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> <p>[*] Catégories spéciales de documents cités: ¹¹</p> <p>« A » document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent</p> <p>« E » document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date</p> <p>« L » document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)</p> <p>« O » document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens</p> <p>« P » document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée</p> </div> <div style="width: 45%;"> <p>« T » document ultérieur publié postérieurement à la date de dépôt international ou à la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention</p> <p>« X » document particulièrement pertinent: l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive</p> <p>« Y » document particulièrement pertinent: l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier.</p> <p>« & » document qui fait partie de la même famille de brevets</p> </div> </div>		
IV. CERTIFICAT N		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée 5 octobre 1988	Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale 04 NOV 1988 ¹	
Administration chargée de la recherche internationale OFFICE EUROPEEN DES BREVETS	Signature du fonctionnaire autorisé P.C.G. VAN DER PUTTEN	

III. DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		(SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDICÉS SUR LA DEUXIÈME FEUILLE)
Catégorie *	Identification des documents cités, avec indication, si nécessaire, des passages pertinents	N° des revendications visées
A	Proc. Natl. Acad. Sci, USA, vol. 83, octobre 1986, The National Academy of Sciences (US) M.A. Gitt et al.: "Evidence that a human soluble beta-galactoside-binding lectin is encoded by a family of genes", pages 7603-7607 (cité dans la demande)	
	--	
A	Chemical Abstracts, vol. 107, 1987 (Columbus, Ohio, US) C. Southan et al.: "Amino acid sequence of beta-galactoside-binding bovine heart lectin. Member of a novel class of vertebrate proteins", voir page 277, résumé no. 73017y & Febs Lett. 1987, 214(2), 301-4 -----	